شناسایی یک پروتئین مهارکننده فعالیت آمیلازی در بذر گندم

مسعود حیدری زاده* و فریبا حسنوند

سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۸

چکیده

پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در دانه بسیاری از گیاهان در زمینه‌های متنوعی مانند تغذیه انسان، تغذیه دام، شیمی پروتئین، داروسازی، بیوشیمی گیاهی و پزشکی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. توانایی این ترکیبات برای ایجاد مشکلات تغذیه‌ای، اثرات سمی و دارویی هنگامی‌که به‌عنوان غذاهای گیاهی مصرف می‌شوند باعث گردیده که در زمینهٔ پراکندگی آنها در گیاهان مطالعات متعددی انجام شود. دراین پژوهش پروتئین‌های بذر گندم واریته زرین استخراج و خالص‌سازی پروتئین موردنظر با روش رسوب جزءبه‌جزء با آمونیوم سولفات، دیالیز و کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گردید. بعد از خالص‌سازی با روش کروماتوگرافی سریع پروتئین با فاز مایع، ویژگی‌های الکتروفوزی این پروتئین با روش الکتروفورز ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید بررسی شد. مهارکنندگی پروتئین مورد نظر در برابر فعالیت آلفاآمیلاز استاندارد (با منشأ باکتریایی) و بزاق انسانی با استفاده از روش برنفلد مورد سنجش قرار گرفت. دیاگرام خالص‌سازی و جمع‌آوری پروتئین مورد نظر را نشان داد. الگوی الکتروفورزی این پروتئین با حرکت نسبی ۰/۵۹ و ۰/۶۰ تأییدی بر فرایند خالص‌سازی پروتئین می‌باشد. فعالیت آلفاآمیلاز استاندارد (با منشأ باکتریایی) به میزان ۸۹/۹۷ درصد و همچنین فعالیت هیدرولیتیک بزاق انسانی توسط این پروتئین به میزان۹۷/۰۷ درصد کاهش نشان داد. به‌طورکلی جداسازی، خالص‌سازی و مهارکنندگی آلفا آمیلازی پروتئین استخراج‌شده از بذر گندم زرین دراین پژوهش تأیید گردید. مهار آلفاآمیلاز باکتریایی توسط این پروتئین با استفاده از روشهای نوین و ابزارهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در کنترل طبیعی بیماریها و آفات گیاهی می‌تواند موردتوجه محققین کشاورزی قرارگیرد. این مهارکننده آلفاآمیلاز همچنین می‌تواند در درمان دیابت و نارسایی‌های گوارشی و اصلاح رژیم‌های غذایی به‌منظور کاهش وزن کاربرد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: گندم، مهارکننده‌های آنزیمی، آلفاآمیلاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۷۸۰۵۴۳، پست الکترونیکی: m.haidarizadeh@uok.ac.ir

مقدمه

بازدارندگان آنزیمی یکی از گروه‌های مهم پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذرها می‌باشند. این ترکیبات در گستره وسیعی از برنامه‌های تحقیقاتی در زمینه تغذیه انسان، تغذیه دام، شیمی پروتئین، داروسازی، بیوشیمی‌گیاهی و پزشکی قرار می‌گیرند (۲۰). بخش عمده‌ای از این یافته‌ها مرتبط با نقش فیزیولوژیک مهارکننده‌های آنزیمی بذرها می‌باشد. این پروتئین‌ها با آنزیم‌های هیدرولیتیک ترکیبات پایدار ایجاد کرده و باعث مهار عملکرد آنها می‌شوند (۱۶). توانایی مهارکننده‌های آنزیمی در ایجاد مشکلات تغذیه‌ای و اثرات سمی هنگامی‌که به‌عنوان غذاهای گیاهی مصرف می‌شوند یکی از دلایل عمده توجه ویژه به آنها در دانه‌ها می‌باشد. مهارکننده‌های پروتئیناز در غلظت‌های زیاد باعث کندی رشد، هیپرتروفی پانکراتیک (افزایش حجم بافت یا اندام در اثر بزرگ شدن یاخته‌های موجود در آن) و هیپرپلازیا (افزایش تعداد یاخته‌های بهنجار در بافت یا عضو) می‌شوند.

مهارکننده‌های آلفاآمیلاز موجود در غذاهای گیاهی به‌ویژه مهارکننده‌های موجود در غلات و حبوبات می‌توانند آنزیم-های بزاقی و پانکراتیک انسانی را غیرفعال سازند. شناخته-شده‌ترین بازدارندگان آنزیمی موجود در بذرها، مهارکننده های سرین پروتئینازهایی مانند تریپسین، کیموتریپسین و سوبتیلیسین می‌باشند. در دهه‌های اخیر توجه ویژه بر روی بازدارندگان آلفاآمیلاز (EC 3.2.1.1) متمرکز شده است. آنزیم‌های دیگر که به‌وسیله پروتئین‌هایی با منشأ گیاهی مهار می‌شوند، نیز پیوسته گزارش شده اند (۲۰). اخیراً به اثبات رسیده است که وقتی مهارکننده دو عملکردی جو (Barley) به آلفاآمیلاز خود گیاه متصل می‌شود، بنیان اختصاصی تریپتوفانی آنزیم را که برای واکنش پیوندی آنزیم- سوبسترا ضروری است، تغییر داده و این فرایند را مختل می‌نماید. این احتمال که این پروتئین‌ها ممکن است سلامت و تندرستی انسان را به مخاطره بیندازند باعث گردیده که در زمینه پراکندگی آن‌ها در گیاهان و به‌ویژه در مورد وجود آن‌ها در بافت‌های گیاهی که به‌عنوان غذا مصرف می‌گردند، مطالعات متعددی آغاز گردد (۶و ۷).

عصاره‌ی خام لوبیای معمولی حاوی مهارکننده‌های آلفاآمیلازی شبه لکتین می‌باشد و به‌عنوان بازدارنده‌های هضم نشاسته، در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ برای کنترل دیابت ملیتوس غیروابسته به انسولین و چاقی به کار رفته است (۵). اخیراً این گروه از مهارکننده‌ها به خاطر داشتن ویژگی‌های حشره‌کشی به‌منظور محافظت از بذرها در برابر حشرات آفت مورداستفاده قرارگرفته‌اند (۱۳). یک گروه تحقیقاتی در کلینیک مایو (Mayo Clinic) ترکیبی از لوبیای سفید را به‌طور نسبی خالص‌سازی کرده و نشان دادند که این ترکیب فعالیت آمیلاز بزاقی، درون‌دئودنال (intraduodenal) و درون‌ایلئال (intraileal) (دو بخش ابتدایی روده کوچک واقع در ناحیه‌ی دوازدهه) را در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) غیرفعال می‌کند (۱و ۱۲).

در پژوهشی دیگر یونی‌کریشنان و همکاران (۲۰۱۵) مهار کننده‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز را به‌منظور معرفی داروی طبیعی دیابت در چهار جلبک سبز شناسایی کردند (۲۵)

هیروشی اونه‌دا و همکاران (۲۰۰۴) مهارکننده‌ی آلفا آمیلازی با حرکت نسبی ۰/۱۹ را که طبق روش چوودهوری و همکاران (۱۹۹۶) و شامل مهارکننده‌های ۰/۱۹، ۰/۲۸، ۰/۳۶، ۰/۳۸، ۰/۵۳ و دیگر مهارکننده‌های آلفاآمیلازی گندم بود خالص‌سازی و معرفی کردند (۱۶).

اوکتاویو لوییز فرانکو و همکاران (۲۰۰۰)، پنج مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی با ویژگیهای ساختاری و حرکت نسبی (۰/۱۹، ۰/۵۳) و وزن مولکولی ۲۵ ، ۲۶ و ۲۷ کیلو دالتونی را از بذرهای گندم خالص‌سازی کرده و فعالیت مهارکنندگی آن‌ها را در برابر آنزیم‌های آلفاآمیلاز پانکراسی خوک و آلفاآمیلاز سه حشره *Callosobruchus maculatus*، *Zabrotes subfasciatus* و *Acanthoscelides obtectus* با استفاده از روش برنفلد (Bernfeld) مورد سنجش قراردادند (۴).

ایوان کلوه (Ivan Kluh) و همکاران (۲۰۰۴) اثر مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی- α-AI-1 بذر لوبیا را پس از تخلیص، بر آلفاآمیلازهای سی گونه از رده‌های اصلی حشرات، بی‌مهرگان و قارچ‌های آسیب‌زای گیاهی مورد مطالعه قراردادند (۸).

صابری و قدم‌یاری (۲۰۱۲) آنزیم آلفاآمیلاز را از روده و همولنف دو حشره *Rhynchophorus ferrugineus Olivieri* جداسازی و مهارکننده‌ای آلفاآمیلازی را از ماش (*Vigna radiate L*) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris L.*) جداسازی کردند (۲۲).

دیفنسین‌ها که به‌عنوان گاماتیونین‌ها نیز شناخته می‌شوند، به‌عنوان ابزارهای بیوتکنولوژیکی در کشاورزی برای کنترل آفت‌ها و پاتوژن‌ها به کار می‌روند. پاتریشیا پیلیگرینی و همکاران (۲۰۰۸)، VuD1 را که یک دیفنسین غیرمعمول

با قابلیت مهارکنندگی آلفاآمیلازهای حشرات می‌باشد، را از بذر نخود *Vigna unguiculata* جداسازی و به‌وسیله‌ی کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص‌سازی کرده و فعالیت بازدارندگی مهارکننده‌ی به‌دست‌آمده را با استفاده از روش برنفلد در برابر آلفاآمیلاز بزاقی انسان، آلفاآمیلاز پانکراسی خوک، آلفاآمیلاز *Acanthoscelides obtectus*، آلفاآمیلاز *Aspergillus fumigates* و آلفاآمیلاز *Callosobruchus maculates* مورد سنجش قراردادند (۱۸).

چارلز دیلر و همکاران (۲۰۰۵) مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی جدیدی با فعالیت کیتینازی از بذرهای لوبیای وحشی جداسازی کردند. مشخص شد که این مهارکننده خالص‌سازی شده فعالیت بازدارندگی قابل‌توجهی در مقابل آلفاآمیلازهای لارو *Z. subfasciatus* دارد اما تقریباً هیچ فعالیتی در مقابل آنزیم‌های پستانداران ندارد (۲).

دراین تحقیق مهارکننده آلفاآمیلاز موجود در بذر گندم واریته زرین جداسازی و تخلیص گردید، ویژگی‌های الکتروفورزی و میزان کاهش فعالیت هیدرولیتیک آمیلازی بزاق انسانی و آلفاآمیلاز باکتریایی در اثر افزودن این مهارکننده به محیط واکنش آنزیم مورد مطالعه قرارگرفت. مطالعه مهارکننده‌های آنزیمی با منشأ گیاهی در محصولات زراعی به‌ویژه گندم که سرانه مصرفی آن در ایران بالاست هدف این تحقیق می‌باشد. باتوجه به اینکه هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد پراکندگی و میزان بازدارندگی مهارکننده‌ها موجود در بذر محصولات زراعی عمده ایران وجود ندارد، بررسی این مهارکننده‌ها در گونه‌ها و واریته-های زراعی ایران ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روشها

استخراج: پنج بذر گواهی‌شده گندم رقم زرین را وزن کرده و در هاون با افزودن دو سانتی‌متر مکعب آب دو بار تقطیر آسیاب گردید (با نسبت w: v ۱:۱۰)(۱۶). استخراج پروتئین در دمای ۲۰ °C به مدت یک ساعت انجام شد. محلول رویی با سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه(RPM) معادل ۱۱۹۶۳ g به مدت ۲۰ دقیقه جدا گردید. این محلول با بافر A (Tris – Hcl 20 m M pH=8) به حجم ۲/۵ ml رسانده شد (۳).

رسوب جزءبه‌جزء پروتئین به‌وسیله آمونیوم سولفات: برای رسیدن به غلظت ۵۰ ـ ۳۵ درصد اشباع (50 – 35 F) ۰/۴۸۵گرم آمونیوم سولفات جامد به محلول پروتئینی مرحله قبل به‌تدریج و به‌آرامی اضافه گردید. محلول رویی در هر مرحله با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) معادل ۲۹۹۱g به مدت ۳۰ دقیقه جدا و پروتئین رسوب یافته در دو میلی‌لیتر از بافر A حل گردید (۳).

دیالیز: مراحل آماده‌سازی کیسه دیالیز انجام و محلول پروتئینی به کیسه دیالیز فعال‌شده منتقل گردید (۳). دیالیز به مدت هشت ساعت در حجمی از بافر A به میزان ml ۲۰۰ برای رسیدن به مرحله تعادل ادامه یافت. بعد از تنظیم pH (pH =8 مانند PH بافر A) دیالیز در ۲۰۰ml از آب دو بار تقطیر به مدت دو ساعت تکرار گردید. نمونه دیالیز شده بعد از انتقال از کیسه‌ی دیالیز به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) معادل ۲۹۹۱g سانتریفیوژ گردید (۳).

کروماتوگرافی سریع پروتئین به‌وسیله فاز مایع (FPLC(Fast protein liquid chromatography: خالص‌سازی پروتئین با روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گردید. محلول پروتئینی بعد از مراحل استخراج، رسوب‌دهی و دیالیز به ستون آماده Hiprep 16/10DEAE تزریق گردید. ستون ابتدا با 100ml بافر A Tris – Hcl 20mM pH=8 با شدت‌جریان (۰/۵ ml / min) با شدت یونی پایین به تعادل رسید. تعادل زمانی کامل می‌گردد که pH بافر خروجی از دستگاه برابر pH بافر A (pH=8) باشد. سپس ۷۵ µL میکرولیتر از نمونه حاصل از مراحل قبل بر روی دستگاه بارگذاری گردیده و سپس تزریق انجام شد. در این مرحله پروتئین‌های موجود با رزین ستون

پیوند برقرار کرده و به آن می‌چسبند. این مرحله ۶۰ دقیقه ادامه یافته و طی آن ml ۳۰ بافر A از ستون عبور نمود. ثابت ماندن پیک دستگاه بیانگر اتمام مرحله پیوند یونی و عدم خروج پروتئین در این مرحله می‌باشد. به‌منظور جدا نمودن پروتئین‌ها بافر (Tris – HCl 20 mM + NaCl 1 B M, pH=8) با شدت یونی بالا از ستون عبور داده شد. پروتئین موردنظر در دقیقه ۸۵ از ستون جدا گردید. تمام بافرها و نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه با کاغذ صافی ۰/۲۲µm صاف گردیدند. روش جایگزین به‌جای کاغذ صافی سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه(RPM) معادل ۱۱۹۶۳g می‌باشد. نمودار ترسیم‌شده توسط PC-Controller با استفاده از نرم‌افزار Unicorn نصب‌شده بر روی رایانه متصل به دستگاه FPLC ^{AKTA} در بخش نتایج شکل۱ ارائه‌شده است.

مطالعه ویژگی‌های الکتروفورزی مهارکننده آلفاآمیلاز خالص‌سازی شده با روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis): بعد از اتمام خالص‌سازی پروتئین مهارکننده آلفاآمیلاز بذر گندم با روش FPLC، فراکشن‌های جمع‌آوری شده برحسب پیک نمودار در لوله‌آزمایش‌های جداگانه جمع‌آوری‌شده و برای مطالعات بعدی در C ^{o}۴- نگه‌داری شدند. برای مطالعه ویژگی الکتروفوزی فراکشن‌های جمع‌آوری شده از روش SDS-PAGE استفاده نمودیم (۶).

نمونه‌های موردمطالعه در این بخش شامل:

نمونه شماره ۱. پروتئین‌های شبه آلبومینی محلول در آب استخراج‌شده با آب مقطر

نمونه شماره ۲. پروتئین رسوب یافته بعد از فرایند رسوب با آمونیوم سولفات و دیالیز، فراکشن اول خارج‌شده از ستون FPLC براساس نمودار ترسیم‌شده که همان پروتئین موردنظر و مهارکننده آلفاآمیلاز می‌باشد.

نمونه شماره ۳ و ۴ دو سری از پروتئین‌های استاندارد با وزن مولکولی معلوم برای رسم نمودار استاندارد تعیین وزن مولکولی (شکل۵)

نمونه (۵ و ۶) دو تکرار از پروتئین‌های محلول در آب بذر گندم زرین نتایج الکتروفوز در ژل به‌صورت شکل ۲ و جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱- نتایج الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین بازدارنده آلفاآمیلاز از بذر گندم زرین، بعد از استخراج، جداسازی و خالص‌سازی با FPLC

وزن مولکولی پروتئین kD	حرکت نسبی Rm (Relative mobility)	پروتئین خارج‌شده ازستون ۲	پروتئینهای استخراج شده با آب ۵، ۶، ۱	فاصله طی شده cm	شماره باند
۱۱۶/۸۵	۰/۱۱		—	۰/۹	۱
۱۱۱/۲۴	۰/۱۲		—	۱	۲
۱۰۰/۷۳	۰/۱۵		—	۱/۲	۳
۶۷/۷۳	۰/۲۵		—	۲	۴
۶۱/۳۳	۰/۲۷		—	۲/۲	۵
۵۳/۱۳	۰/۳۱		—	۲/۵	۶
۳۲/۲۷	۰/۴۳		—	۳/۵	۷
۲۲/۷۵	۰/۵۲		—	۴/۲	۸
۱۷/۵۸	۰/۵۹	—	—	۵/۳	۹
۱۶/۹۶	۰/۶۰	—	—	۵/۵	۱۰
۹/۳۲	۰/۷۵		—	۶	۱۱
۷/۲۷	۰/۸۱		—	۶/۵	۱۲

علامت- نشان‌دهنده وجود باند پروتئینی در همان موقعیت است

روش سنجش فعالیت آلفاآمیلاز: به‌منظور اندازه‌گیری میزان کاهش فعالیت آلفاآمیلاز در بزاق انسانی و آلفاآمیلاز با منشأ باسیلوس سوبتیلس (استاندارد) زمانی که مهارکننده آلفاآمیلاز به مخلوط واکنش آن‌ها اضافه می‌شود، از روش سنجش فعالیت هیدرولیتیک از روش برنفلد استفاده نمودیم. مهارکننده آلفا آمیلاز موجود در بذر گندم (زرین) بعد از مراحل خالص‌سازی با روش FPLC تا زمان سنجش فعالیت هیدرولتیک در دمای $^{\circ}C$ ۴- در اپندورف نگه‌داری گردید. یک میلی‌لیتر از هرکدام از نمونه‌های موردمطالعه (۴ نمونه) با شش میلی‌لیتر از محلول استخراج در بستر یخ به‌خوبی هموژن گردید. برای صاف نمودن عصاره هموژن از پارچه نخی چندلایه استفاده گردید. عصاره صاف‌شده به مدت ۱۵ دقیقه در g ۴۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محیط واکنش آنزیمی شامل ۳ میلی‌لیتر نشاسته ۲ درصد و سه میلی‌لیتر از عصاره استخراج محتوی نمونه‌ها تهیه گشته به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ نگه‌داری گردید. سپس یک میلی‌لیتر از محیط واکنش با یک میلی‌لیتر از معرف رنگی دی نیتروسالیسیلیک اسید به‌آرامی مخلوط گردیده و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد گردیده و شدت جذب نوری آن‌ها در طول‌موج ۵۴۶ نانومتر خوانده شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از معادله استاندارد مالتوز و با در نظر گرفتن میزان رقیق نمودن آن‌ها محاسبه گردید (۲۱). گروههای احیاکننده در کنار ماده‌ی ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید، ترکیبات رنگی ایجاد می‌نمایند. میزان ترکیبات رنگی ایجادشده با میزان گروههای احیاکننده حاصل از فعالیت هیدرولازی نسبت مستقیم دارند. ماکزیمم جذب نوری ترکیبات رنگی حاصله در طول‌موج ۵۴۶ نانومتر قراردارد. برای سنجش مهارکنندگی پروتئین خالص‌سازی شده از بذر گندم، به‌عنوان مهارکننده آلفاآمیلاز روش سنجش فعالیت هیدرولیتیک بر مبنای استفاده از ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید (روش برنفلد) مبنای عمل گرفت (۲۱).

در این سنجش فعالیت هیدرولیتیک چهار نمونه زیر باهم مقایسه گردید:

۱- محلول آلفا آمیلاز باسیلسوس سوبتیلیس (Merck Art 1329) با غلظت ۱ mg / ml به‌عنوان شاهد

۲- محلول آلفا آمیلاز باسیلسوس سوبتیلیس (Merck Art 1329) با غلظت ۱ mg / ml به همراه یک میلی‌لیتر مهارکننده آلفا آمیلاز خالص‌شده با مراحل FPLC

۳- بزاق انسانی رقیق‌شده (۱: ۳) با آب دو بار تقطیر بدون مهارکننده به‌عنوان شاهد

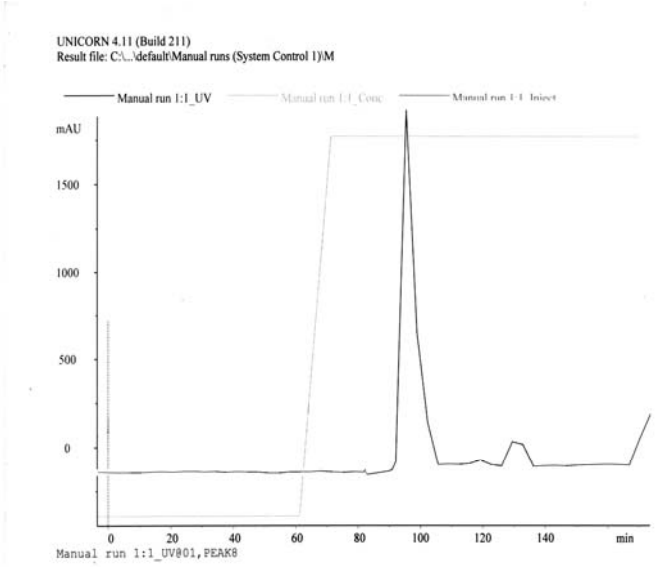
۴- بزاق انسانی رقیق‌شده (۱:۳) با آب دو بار تقطیر به همراه یک میلی‌لیتر مهارکننده آلفا آمیلاز خالص‌شده با مراحل FPLC

برای قابل‌مقایسه و معنی‌دار بودن نتایج از هریک از نمونه‌ها ۳ تکرار در آزمایش لحاظ گردید (جدول۲).

نتایج

نتایج کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ستون تعویض‌کننده‌ی آنیونی DEAE و سیستم FPLC AKTA ™ به‌صورت شکل ۱ نشان داده‌شده است. این منحنی شدت جذب نوری پروتئین خارج‌شده از ستون را در طول‌موج ۲۸۰nm با استفاده از لامپ UV مرتبط با دستگاه نشان می‌دهد. پروتئین‌ها در pH بالاتر و یا پایین‌تر از pH ایزو الکتریک خود به‌صورت مثبت و یا منفی باردار شده و همراه بافر آغازکننده (بافر A) بر روی ستون اعمال‌شده و به ذرات باردار ستون متصل می‌شوند. با تغییر شرایط به‌صورت افزایش غلظت نمک یا تغییر pH که با جایگزینی بافر A توسط بافر B (بافر جداکننده)، صورت می‌پذیرد پروتئین‌های متصل شده در مرحله قبلی براساس شدت پیوند یونی با لیگاندهای ستون به‌صورت مجزا همراه بافر B از ستون خارج می‌شوند و بدین ترتیب جداسازی یک نوع پروتئین صورت می‌گیرد. در این دستگاه برای شناسایی پروتئین خارج‌شده از لامپ UV و مانیتور UV با

فیلتر ۲۸۰ نانومتری در مسیر عبور پروتئین در بخش flow cell تعبیه گردیده است. دراین بخش همانند یک اسپکتروفتومتر، شدت جذب نوری نمونه عبوری در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و در بخش مانیتور UV نمایش داده و نرم‌افزار unicorn نصب‌شده آن را به‌صورت منحنی شدت جذب در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر برحسب زمان تزریق نمونه نمایش می‌دهد. شکل ۱ نمودار ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار unicorn مرتبط با دستگاه AKTA ^{TM} FPlC را نشان می‌دهد.



شکل ۱- پیک ترسیم‌شده توسط نرم‌افزار unicorn مرتبط با دستگاه AKTA FPlC

مهارکننده آلفاآمیلاز استخراج‌شده از بذر گندم (زرین) که بامحلول ۵۰- ۳۵ درصد اشباع آمونیوم سولفات رسوب یافته و با ستون‌کروماتوگرافی تعویض‌یونی آنیونی آماده DEAE ^{FF} جداسازی شده است. پروتئین هنگام اعمال ۱۰۰ درصد بافر جداکننده در دقیقه ۸۰ شروع به خروج از ستون نموده است.

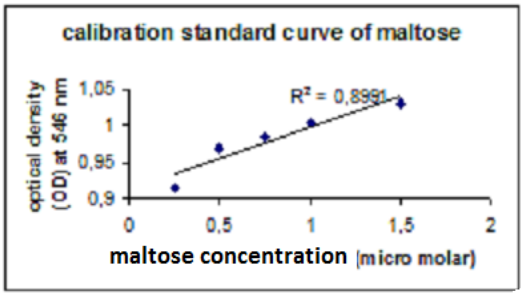
فراکشن جمع‌آوری‌شده حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی به‌منظور شناسایی، تعیین ویژگی، اطمینان از خلوص و دیگر ویژگی‌ها، با روش SDS-PAGE الکتروفورز گردید. روش اجرایی کامل الکتروفورز نمونه در منابع توضیح داده شده است (۶). نتیجه الکتروفورز به‌صورت شکل ۲ و داده‌های مرتبط با آن در جدول شماره ۱ نشان داده‌شده است. ستون اول، پنجم و ششم پروتئین‌های شبه آلبومینی محلول در آب بذر گندم استخراج‌شده با آب مقطر را نشان می‌دهد.

شکل ۳ نشان می‌دهد که فعالیت هیدرولیتیک آلفاآمیلاز استاندارد (با منشأ باکتریایی) به میزان ۸۹/۹۷ درصد توسط مهارکننده کاهش‌یافته است. همچنین فعالیت هیدرولیتیک بزاق انسانی (با لحاظ‌کردن مقدار رقیق نمودن نمونه‌ها) توسط مهارکننده آلفاآمیلاز استخراج‌شده و خالص‌سازی شده از بذر گندم (زرین) به میزان۹۷/۰۷ درصد کاهش یافته است. در جدول ۲ نتایج اندازه‌گیری میزان کاهش فعالیت آلفاآمیلاز در بزاق انسانی و آلفاآمیلاز با منشأ باسیلوس سوبتیلس (استاندارد) با استفاده از روش برنفلد زمانی که مهارکننده آلفاآمیلاز به مخلوط واکنش آن‌ها اضافه می‌شود نشان داده شده است، آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و محاسبه انحراف معیار و رسم نمودار با نرم‌افزار اکسل انجام گردید.

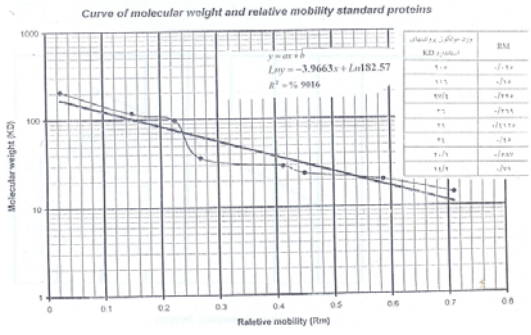
شکل ۴ نمودار استاندارد مالتوز ترسیم‌شده با روش برنفلد و شکل ۵ نمودار استاندارد اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین براساس حرکت نسبی روی ژل را نشان می‌دهد.

جدول ۲- میزان کاهش فعالیت آلفا آمیلاز توسط مهارکننده استخراج شده از بذر گندم بعد از خالص‌سازی ؛ بر اساس مالتوز تولید شده

نمونه	تکرار	OD	میانگین ±Sd	غلظت محاسبه شده مالتوز با منحنی استاندارد	درصد بازدارندگی
آلفاآمیلاز استاندارد با منشأ aus Bacillus subtilis (MerckArt.1329) 1mg/1ml	اول	۰/۸۱۷	۰/۸۰۸± ۰/۰۰۶	۲۷/۴۳µm	
	دوم	۰/۸۰۸			
	سوم	۰/۷۹۹			
آلفاآمیلاز استاندارد با منشأ aus Bacillus subtilis (MerckArt.1329) 1mg/1ml + مهارکننده آلفاآمیلازموجوددر بذر گندم زرین بعدازخالص سازی باFPLC	اول	۰/۵۹۰	۰/۵۸۰± ۰/۰۱۶	۲/۷۵µm	۸۹/۹۷%
	دوم	۰/۵۵۷			
	سوم	۰/۵۹۵			
بزاق انسانی	اول	۰/۹۹۱	۰/۹۹۱± ۰/۰۰۴	۱۲۹/۸۶µm	
	دوم	۰/۹۸۵			
	سوم	۰/۹۹۸			
بزاق انسانی + مهارکننده آلفاآمیلازموجوددر بذر گندم زرین بعدازخالص سازی با FPLC	۱	۰/۸۲۰	۰/۸۲۳± ۰/۰۱۶	۳/۸۰µm	۹۷/۰۷%
	۲	۰/۸۵۱			
	۳	۰/۸۰۰			



شکل ۴- نمودار استاندارد مالتوز ترسیم شده با روش برنفلد



شکل ۵- نمودار استاندارد اندازه‌گیری وزن مولکولی پروتئین بر اساس حرکت نسبی بر روی ژل

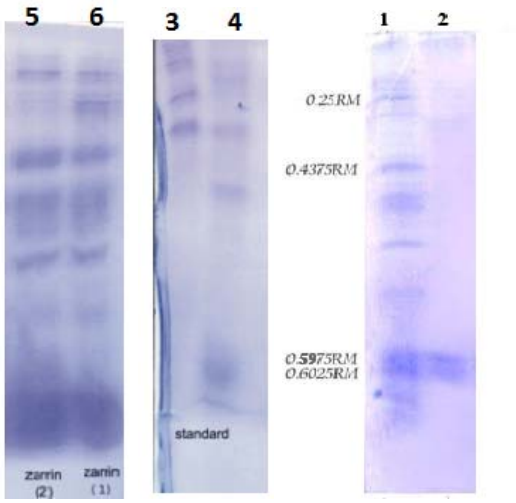
بحث و نتیجه‌گیری

شکل ۱ نشان می‌دهد که از دقیقه ۱ تا ۶۲ بافر A به دستگاه اعمال گردیده است. در دقیقه ۶۲ بافر A با بافر B جایگزین گردیده است. بافر B بافر جداکننده بوده و محتوی بافر A و NaCl یک مولار می‌باشد. پروتئین‌های موجود در نمونه با توجه به سیستم و pH بافر به‌صورت منفی باردار شده و به ذرات ستونDEAE که دارای گروه تبادل کننده $N^{+}(C_2H_5)_2$ H دی اتیل آمینو اتیل با بار مثبت می‌باشد متصل می‌شوند. در مرحله اول پروتئین‌ها به علت قرارگرفتن در pH بالاتر از pH ایزوالکتریک دارای بار منفی شده و به ستون دارای گروه باردار شونده مثبت، متصل می‌شوند. با اعمال بافر جداکننده با شدت یونی قوی (Nacl 1M یون‌های Cl جایگزین پروتئین‌ها شده و پروتئین‌ها از ستون جداشده و همراه بافر خارج می‌شوند. به علت پیوند یونی با شدت یکسان، تمام مولکول‌های یک

پروتئین ویژه در یک‌زمان معین باهم از ستون جداشده و این به فرایند تخلیص کمک می‌نماید. اولین پروتئین در دقیقه ۹۰ از زمان تزریق نمونه و تقریباً ۳۰ دقیقه بعد از جایگزینی بافر B از ستون خارج‌شده و ماکزیمم جذب نوری را نشان می‌دهد در طی ده دقیقه این پروتئین به حداکثر تجمع رسیده و به‌طور کامل از ستون خارج می‌شود. با توجه به‌شدت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به همراه پروتئین تقریباً ۵ سی‌سی بافر B نیز در فراکشن اول جمع‌آوری گردید. در برخی روش‌ها برای تغلیظ نمونه در این مرحله روش‌های ویژه‌ای به‌کار برده شده است در این آزمایش فراکشن جمع‌آوری‌شده را همراه با بافر به مدت ۲۴ ساعت در دیسکاتور محتوی هیدروکسید سدیم به‌منظور آبگیری قرارداده شد. نمونه تغلیظ شده برای مطالعات تکمیلی مورداستفاده قرارگرفت.

همچنان که جدول ۱ نشان می‌دهد در این ستون ۱۲ باند پروتئین تفکیک‌شده‌اند که حرکت نسبی آن‌ها از ۰/۱۱ تا ۰/ ۸۱ متغیر می‌باشد. ستون دوم شامل پروتئین‌های رسوب یافته با آمونیوم‌سولفات می‌باشد یعنی از گروه پروتئین‌های شبه آلبومینی (ستون ۱) با استفاده از رسوب جزءبه‌جزء توسط محلول ۵۰- ۳۵ درصد اشباع آمونیم سولفات پروتئین‌های ستون دوم رسوب یافتند، که شامل دو باند پروتئین یعنی باندهای شماره ۹،۱۰ می‌باشند پروتئین مهارکننده آلفاآمیلاز (هدف) در باندهای ۹ و ۱۰ دیده می‌شود. برای اطمینان و پیگیری دقیق مراحل خالص‌سازی نمونه پروتئینی بعد از دیالیز الکتروفورز گردید.

فراکشن جمع‌آوری و خارج‌شده از دستگاه مطابق پیک شکل۱ بعد از مراحل تغلیظ به‌صورت ستون شماره دو الکتروفورز گردید. الگوی الکتروفورزی نمونه‌ها که در شکل ۲ نشان داده‌شده است، تأییدی بر فرایند خالص‌سازی پروتئین مورد نظر یعنی پروتئین مهارکننده آلفاآمیلاز استخراج‌شده از بذر گندم هست. این پروتئین دارای حرکت نسبی ۰/۵۹ و ۰/۶۰ بوده و فاصله طی شده توسط آن بر، روی ژل ۵/۵ و ۵/۳ سانتی‌متر از ابتدای ژل می‌باشد. مقایسه این شکل با پیک شکل ۱ نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد.



ج ب الف

شکل ۲- مطالعه ویژگی‌های الکتروفورزی مهارکننده آلفاآمیلازبذرگندم خالص‌سازی و جمع‌آوری‌شده از AKTA FPLC™

الف ۱) پروتئین‌های محلول در آب بذر گندم ۲) پروتئین رسوب یافته با محلول ۵۰-۳۵٪ اشباع آمونیوم سولفات پروتئین موجود در فراکشن اول جمع‌آوری‌شده از ستون‌کروماتوگرافی تعویض‌یونی.

ب ۳) دو سری از پروتئینهای استاندارد با وزن مولکولی معلوم برای رسم نمودار استاندارد تعیین وزن مولکولی (شکل ۵)

ج ۵و۶) دو تکرار از پروتئینهای محلول در آب بذر گندم زرین تکرار باکیفیت تر ستون ۱

شکل ۱ وجود تنها یک پروتئین را اثبات می‌نماید، درحالی‌که ژل الکتروفورز وجود ۲ باند پروتئین را به‌طور واضح نشان می‌دهد. تفسیر این است که دو باند مشاهده‌شده در حقیقت نشان‌دهنده دیمربودن این پروتئین ویژه می‌باشد یعنی پروتئین اصلی که در شکل ۱ به‌صورت یک نمودار دیده می‌شود در مراحل مختلف الکتروفورز به‌ویژه هنگام استفاده از مواد و معرف‌هایی نظیر مرکاپتواتانول، آمونیم پرسولفات (APS) و سدیم دو دسیل سولفات (SDS) با احیاء باندهای دی‌سولفیدی دو زنجیر دیمر آن از هم جداشده و به‌صورت دو باند پروتئینی که وزن مولکولی بسیار نزدیک به هم دارند دیده می‌شوند. این

تفسیر با نتایج دیگر محققین که بیانگر شناسایی یک مهارکننده دیمر توسط آن‌ها می‌باشد هم‌خوانی دارد (۱۱، ۱۵، ۱۹، ۲۱ و ۲۳). مائده و همکاران (۱۹۸۵) مهارکننده آلفاآمیلاز با فرم ۰/۶۲ و وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون را که به‌صورت دایمری بود معرفی و شناسایی کردند (۱۱). دیگر فرمهای دایمری ۰/۲۳،۰/۵۳، ۰/۲۸، ۰/۱۹ نیز توسط دیگر محققین شناسایی و معرفی‌شده‌اند.

مهارکننده آلفاآمیلاز خالص‌سازی شده توسط این مطالعه بسیار شبیه پروتئینی می‌باشد که توسط مائده و همکاران (۱۹۸۵) گزارش گردیده است (Rm=۰/۶۶) (۱۱).

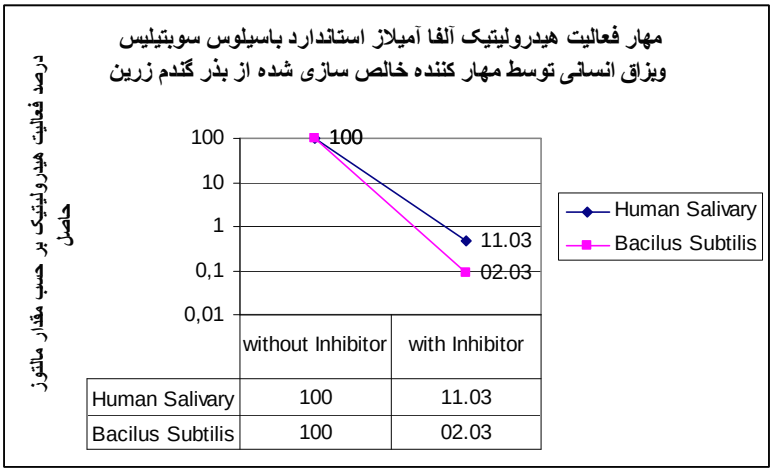
مهارکننده‌های آلفاآمیلاز فعالیت هیدرولیتیک آنزیم را مهار کرده و عمل کاتالیتیکی آن را متوقف می‌نمایند. برای سنجش میزان مهارکنندگی عموماً از نشاسته محلول استفاده می‌شود. آلفاآمیلاز در گروه اندوگلیکوزیدازها قرار داشته و پیوندهای آلفا ۱ و ۴ گلیکوزیدی را در پلی‌ساکاریدها به‌صورت تصادفی در قسمت داخلی هیدرولیز می‌نماید، نتیجه واکنش عمدتاً دکسترین و به مقدار کم گلوکز می‌باشد (۱۶). گروه‌های احیاکننده که توسط شکافته شدن هیدرولیتیک پیوندهای گلیکوزیدی بین قندها تشکیل می‌شوند، مبنای سنجش فعالیت آنزیم قرار می‌گیرند.

چهار نمونه‌ای که دراین تحقیق فعالیت هیدرولیتیک آن‌ها باهم مقایسه گردید، شامل آلفا آمیلاز استاندارد بدون مهارکننده، آلفاآمیلاز استاندارد همراه با مهارکننده، بزاق انسانی رقیق‌شده بدون مهارکننده و بزاق انسانی رقیق‌شده همراه با مهارکننده بودند. از هر نمونه سه تکرار برای قابل‌اطمینان بودن نتایج بکار برده شد. مبنای مقایسه فعالیت آمیلازی در ۴ نمونه فوق، بر اساس میزان مالتوز حاصل از فعالیت هیدرولیتیک آنزیم می‌باشد. هرچه میزان فعالیت آنزیم بیشتر باشد، غلظت مالتوز ایجادشده در محلول واکنش بیشتر خواهد بود. در نمونه‌های شماره دو و چهار به مقدار یک میلی‌لیتر از مهارکننده جمع‌آوری‌شده از فراکشن شماره یک دستگاه بعد از خالص‌سازی، استخراج، رسوب و دیالیز به محلول واکنش اضافه شد. مشاهده می‌شود که غلظت مالتوز اندازه‌گیری شده در این نمونه‌ها در مقایسه با نمونه‌های ۱ شماره یک و دو که مهارکننده اضافه نگردیده است، به‌طور کاملاً معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد. با محاسبه مقادیر مالتوز در نمونه دارای مهارکننده و نمونه بدون مهارکننده، درصد بازدارندگی فعالیت آمیلازی توسط مهارکننده محاسبه گردید (جدول ۲).

شکل ۳ نشان می‌دهد که فعالیت هیدرولیتیک آلفاآمیلاز استاندارد (با منشأ باکتریایی) به میزان ۸۹/۹۷ درصد توسط مهارکننده کاهش‌یافته است. همچنین فعالیت هیدرولیتیک بزاق انسانی (با لحاظ‌کردن مقدار رقیق نمودن نمونه‌ها) توسط مهارکننده آلفاآمیلاز استخراج‌شده و خالص‌سازی شده از بذر گندم (زرین) به میزان۹۷/۰۷ درصد کاهش‌یافته است. مهارکننده‌های آلفاآمیلاز با منشأ گیاهی به‌طور ویژه در بذر غلات و حبوبات به فراوانی یافت شده و به‌طور گسترده مطالعه شده‌اند. زیرا در حفاظت از گیاه در برابر حشرات و آفات میکروبی دارای نقش می‌باشند (۹، ۱۰، ۱۶ و ۲۳). علاوه بر این آن‌ها به‌عنوان عامل ایجاد حساسیت و آلرژن در بیماری آسم نانوایان Baker's (asthma) شناخته می‌شوند (۲۱).

برخی از مهارکننده‌های موجود در گندم به‌شدت آلفاآمیلاز حشرات را مهار نموده ولی بر آلفاآمیلاز پستانداران اثر ندارند، این مشاهده پیشنهاد می‌نماید که مهارکننده‌ها می‌توانند به‌عنوان ابزاری برای افزایش مقاومت غلات در برابر آفات به کار گرفته شوند. آفات و پاتوژن‌های گیاهی به‌عنوان عوامل کاهش محصولات کشاورزی مطرح هستند. تغذیه مستقیم آفات از گیاه باعث ایجاد صدمه و آسیب در گیاه شده و مکانیسم‌های دفاعی گیاهی را تحریک می‌نماید. ترکیبات دفاعی گیاه شامل ترکیبات غیرپروتئینی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، آلکالوئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات گلیکوزیدی سیانوژنیک و از گروه ترکیبات پروتئینی می‌توان به کیتینازها، گلوکانازها، لکتین‌ها، آرسلین‌ها، ویسیلین‌ها و

مهارکننده‌های آنزیمی اشاره نمود. مهارکننده‌های آنزیمی فرایند هضم را از طریق مهار آلفاآمیلاز و پروتئیناز بزاق حشره مختل می‌نمایند (۱۶). دفاع طبیعی گیاهان به‌ویژه در محصولات زراعی استراتژیک با استفاده از تکنولوژی ترانسژنیک و سیستم‌های دفاعی متنوع گیاهی می‌تواند با ابزارهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک بهبود یابد. امروزه بیشترین تحقیقات در این زمینه بروی Weevils (نوعی سوسک مزرعه) متمرکز می‌باشد زیرا برای تأمین انرژی شدیداً به نشاسته و فعالیت آمیلازی وابسته است (۱۷).



شکل ۳- نمودار درصد کاهش فعالیت آلفاآمیلاز باسیلوس سوبتیلیس و بزاق انسانی بعد از افزایش مهارکننده خالص‌سازی شده از بذر گندم زرین به محیط واکنش برحسب میکرومول مالتوز تولید شده در محیط واکنش

مهارکننده‌های آلفاآمیلازی گندم، به سه خانواده‌ی ۶۰، ۱۲ و ۲۴ کیلودالتونی تقسیم می‌شوند. خانواده‌ی ۶۰ کیلودالتونی هتروتترامرها هستند. خانواده‌ی ۱۲ کیلودالتونی مونومری بوده و مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی ۰/۲۸(این عدد براساس حرکت الکتروفورزی آن بر روی ژل غیردناتوره کننده (native) است) شامل می‌شود. خانواده‌ی ۲۴ کیلو دالتونی، شامل مهارکننده‌های آلفاآمیلازی ۰/۱۹، ۰/۳۸و ۰/۵۳ می‌باشد که دایمری می‌باشند. مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی ۰/۱۹ از خانواده‌ی ۲۴ کیلودالتونی جزء اصلی مهارکننده‌های آلفاآمیلازی گندم است. این مهارکننده می‌تواند آلفاآمیلازهای با منشأهای مختلف شامل آلفاآمیلازهای *Bacillus subtilis*، کرم آرد زرد، آفت نخود، آفت لوبیای مکزیکی، آفت لوبیا، پانکراس خوکی، پانکراس مرغی و بزاق و پانکراس انسان را مهار کند. مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی ۰/۱۹ به‌صورت یک همودایمر با وزن مولکولی ۲۶/۶ کیلو دالتون است، که به‌صورت دو زیر واحد ۱۳/۳ کیلو دالتونی یکسان متشکل از ۱۲۴ باقیمانده‌ی آمینواسیدی می‌باشد که با میان کنش‌های غیرکوالانت به هم مرتبط می‌شوند. نوع بازدارندگی این مهارکننده در مقابل آلفاآمیلاز پانکراسی به‌صورت رقابتی می‌باشد، چراکه مشخص‌شده است مولکول آنزیمی به هومودایمر این بازدارنده متصل می‌شود. فعالیت بازدارندگی بالای مهارکننده‌ی آلفاآمیلازی ۰/۱۹ در مقابل آمیلاز پانکراسی خوک و پایداری دمایی بالای آن نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالقوه آن برای پیشگیری و درمان چاقی و دیابت می‌باشد (۱۶). مهارکننده آلفاآمیلاز خالص‌سازی شده در این مطالعه را می‌توان در گروه ۲۴ کیلو دالتونی و نزدیک به ۰/۵۳ که دایمریک هستند، طبقه‌بندی کرد. گزارش شده است گروه مونومریک مهارکننده‌های آمیلازی گندم، به‌طور ویژه‌ای آمیلازهای حشرات را مهار می‌کنند، درحالی‌که مهارکننده‌های آمیلازی دایمریک گندم، آمیلازهای حشرات و همچنین آمیلازهای

بزاق انسانی و آمیلازهای پانکراسی خوک را مهار می‌کنند (۲۴).

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت هیدرولیتیک بزاق انسانی توسط مهارکننده خالص‌سازی شده از بذر گندم زرین، به‌طور قاطع مهار گردید. نتایج شناسایی یک پروتئین با ۰/۶۰ و وزن مولکولی تقریبی Kd ۱۶/۹۶ را تائید نمود. دو باند مشاهده‌شده نشان‌دهنده‌ی دیمر بودن این پروتئین می‌باشد. فعالیت هیدرولیتیک آلفاآمیلاز استاندارد (با منشأ باکتریایی) به میزان ۸۹/۹۷ درصد توسط این پروتئین مهار گردید. همچنین فعالیت هیدرولیتیک بزاق انسانی توسط این پروتئین به میزان ۹۷/۰۷ درصد کاهش یافت.

مکانیسم واکنش مهارکنندگی در مورد مهار آلفا آمیلاز بوسیله مهارکننده‌های پروتئینی گیاهی به‌طور روشن درک نشده است. ولی فرضیه‌هایی مبتنی براین که قندهای احیاکننده که به‌طور کووالانسی به زنجیره پلی‌پپتیدی مهارکننده متصل می‌شوند ممکن است نقش عمده‌ای در مکانیسم واکنش مهار داشته باشند ارائه گردیده است و یا این‌که پروتئین‌های مهارکننده ممکن است باعث تغییر در ساختار فضایی و سه‌بعدی مولکول آنزیم شوند. اخیراً به اثبات رسیده است که وقتی مهارکننده دو عملکردی جو به آلفا آمیلاز با منشأ درونی متصل می‌شود، بنیان اختصاصی تریپتوفانی آنزیم را که برای واکنش پیوندی آنزیم- سوبسترا ضروری است، تغییر داده و این فرایند را مختل می‌نماید. داده‌هایی که در مورد واکنش سرین پروتئیناز و مهارکننده‌های آن وجود دارد نشان می‌دهد که مهارکنندگی کاملاً رقابتی بوده و در نسبت (۱:۱) فعالیت آنزیم کاملاً متوقف می‌گردد. مطالعات کریستالوگرافی، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) و . . . نشان داد که مهارکننده به‌عنوان سوبسترای بسیار اختصاصی آنزیم عمل کرده و به پپتید ویژه و یگانه‌ای که در جایگاه واکنش قرارگرفته متصل می‌شود. برخلاف پیوند معمولی آنزیم- سوبسترا و آنزیم- فراورده که به‌آسانی ازهم‌گسسته می‌شوند پیوند آنزیم- مهارکننده بسیار پایدار می‌باشد (۴، ۱۸و۵).

مهار آلفاآمیلاز باکتریایی توسط این مهارکننده می‌تواند به‌منظور کنترل طبیعی بیماری‌ها و آفات گیاهی موردتوجه محققین کشاورزی قرار گیرد. همچنین کاربردهای ویژه مهارکننده‌های آلفاآمیلاز در درمان دیابت و نارسایی‌های گوارشی و اصلاح رژیم‌های غذایی به‌منظور کاهش وزن که امروزه در جمعیت ایران بسیار شایع می‌باشند، زمینه تحقیقاتی جدیدی است که می‌تواند موردتوجه محققین علوم پزشکی کشور قرارگیرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات و پژوهش‌های آینده، خالص‌سازی کامل مهارکننده‌های آلفاآمیلازی به‌وسیله‌ی کروماتوگرافی تبادل آنیونی و سپس HPLC فاز معکوس انجام و پروتئینهای به‌دست آمده برای سنجش اثر مهارکننده‌گی جمع‌آوری شوند. همچنین اثر این مهارکننده‌ها بر روی آلفاآمیلازهای پانکراسی انسانی به‌عنوان راهبردی برای درمان دیابت نوع دوم بررسی گردند.

منابع

1- Barrett, M. L., and Udani, J. K., 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris), a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. Nutrition Journal, Dec, 10(1), 24 p.

2- Dayler, C. S., Mendes, P. A., Prates, M. V., Bloch, C., Franco, O. L., and Grossi-de-Sá, M. F., 2005. Identification of a novel bean α-amylase inhibitor with chitinolytic activity, FEBS letters, Oct 24, 579(25), PP: 5616-20.

3- Doonan, S. H., 1996. Methods in molecular biology. Volume 59. Humana press.Totowa, New Jersey.

4- Franco, O. L., Rigden, D. J. R., Melo, F., Bloch, C., Silva, C. P., Grossi de Sá, M. F., 2000. Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. The FEBS Journal, Apr 1, 267(8), PP: 2166-73.

5- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant α-amylase

inhibitors and their interaction with insect α-amylases. The FEBS journal, Jan 1, 269(2), PP: 397-412.

6- Hames, B.D. ed., 1998. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach (Vol. 197). OUP Oxford.

7- Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch, J. r. C., Rigden, D. J., and de Sá, M. F., 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α-amylase inhibitor from Secale cereale (rye), the international journal of biochemistry and cell biology, Dec 1, 32(11-12), PP: 1195-204.

8- Kluh, I., Horn, M., Hýblová, J., Hubert, J., Dolečková-Marešová, L., Voburka, Z., Kudlíková, I., Kocourek, F., and Mareš, M., 2005. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α-amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris, Phytochemistry, Jan 1, 66(1), PP: 31-9.

9- Kondo, N. K., and Ida, E. I., 1995. Extraction, purification and some partial characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat Iapar 28-Igapó, Archivos latinoamericanos de nutricion, Dec, 45(4), PP: 310-6.

10- Korot'ko, G. F., and Bulgakova, V. A., 2002. Use of a salivary alpha-amylase inhibitor in the saliva biochemical study. Klinicheskaia laboratornaia diagnostika. Mar (3), PP: 20-2.

11- Maeda, K., Tamakoshi, K., Yamashita, A., and Fukumoto, T., 1985. Monoclonal antibodies against an α-amylase inhibitor from wheat kernel. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, Apr 29, 828 (3), PP: 222-8.

12- Moreno, J., Altabella, T., and Chrispeels, M. J., 1990. Characterization of α-amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of Phaseolus vulgaris. Plant physiology, Mar 1, 92(3), PP: 703-9.

13- Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong, E., and Higgins, T. J., 2000. Bean α-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (Pisum sativum) provides complete protection from pea weevil (Bruchus pisorum) under field conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences. Apr 11, 97(8), PP: 3820-5.

14- Franco, O. L., Rigden, D. J. R., Melo, F., Bloch, C., Silva, C. P., and Grossi de Sá, M. F., 2000. Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. The FEBS Journal. Apr 1, 267(8), PP: 2166-73.

15- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., and Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. The FEBS journal. Jan 1, 269(2), PP: 397-412.

16- Oneda, H., Lee, S., and Inouye, K., 2004. Inhibitory effect of 0.19 α-amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α-amylase and its thermal stability. The journal of biochemistry. Mar, 135(3), PP: 421-7.

17- Petrucci, T. A., Sannia, G., Parlamenti, R., Silano, V., 1978. Structural studies of wheat monomeric and dimeric protein inhibitors of α-amylase. Biochemical Journal. Jul 1,173(1), PP: 229-35.

18- Pelegrini, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A., and Franco, O. L., 2008. Novel insights on the mechanism of action of α-amylase inhibitors from the plant defensin family. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. Nov 15, 73(3), PP: 719-29.

19- Ramasubbu, N., Ragunath, C., Mishra, P. J., Thomas, L. M., Gyémánt, G., and Kandra, L., 2004. Human salivary α-amylase Trp58 situated at subsite− 2 is critical for enzyme activity. The FEBS Journal, Jun 1, 271(12), PP: 2517-29.

20- Richardson, M., 1991.Methods in plant biochemistry.Volume 5 Academic press, PP: 259-305.

21- Roy, I., and Gupta, M. N., 2000. Purification of adouble-headed'inhibitor of α-amylase/Proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. Bioseparation, Jul 1, 9(4), PP: 239-45.

22- Riseh, N. S., and Ghadamyari, M., 2012. Biochemical characterization of α-amylases from gut and hemolymph of Rhynchophorus ferrugineus Olivieri (Col.: Curculionidae) and their inhibition by extracts from the legumes Vigna radiata L. and Phaseolus vulgaris L. ISJ. Jan 1, 9, PP: 72-81.

23- Sharma, P., Shankar, P. R., Subramaniam, G., Kumar, A., Tandon, A., Suresh, C. G., Rele, M. V., and Kumar, L. S., 2009. Cloning and

sequence analysis of the amylase gene from the rice pest Scirpophaga incertulas Walker and its inhibitor from wheat (Variety Mp (Variety MP Sehore). International Journal of Insect Science 2010, 1, PP: 29-44.

24- Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., Glockshuber, R., 1998. A novel strategy for inhibition of α-amylases: yellow meal worm α-amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. Structure. Jul 15, 6(7), PP: 911-21.

25- Unnikrishnan, P. S., Suthindhiran, K., and Jayasri, M. A., 2015. Alpha-amylase inhibition and antioxidant activity of marine green algae and its possible role in diabetes management. Pharmacognosy magazine, Oct, 11(Suppl 4), S511p.

Identification of a protein that inhibit amylase activity in seed of wheat

HeidariZadeh M.* and Hasanvand F.

Dept. of Biological Science, Faculty of basic Sciences, Kordestan University, Sanandaj, I.R of Iran

Abstract

Storage proteins which found in seeds of many plants are studied in various fields such as human and animal nutrition, chemistry of protein, pharmacology, plant biochemistry and medicinal plants. The ability of these compounds to cause nutritional problems and toxic effects when used as foods has led to several studies on their dispersion in plants. In this research, seed proteins of wheat (Zarrin variety) have been extracted. The protein of interest was purified by ammonium sulfate precipitation method; dialysis and ion exchange chromatography. After purification by Fast protein liquid chromatography (FPLC), electrophoretic properties of this protein were investigated by Sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. Inhibitory activity of this Protein against Bacterial alpha-amylase and human saliva were measured using the Bernfeld method. FPLC diagram illustrates the purification and collection of the desired protein. The electrophoretic pattern of this protein with relative mobility of 0.60 and 0.59 confirmed the purification process. Hydrolytic activity of bacterial and human saliva Alpha- amylase decreased by this protein 89.97% and 97.07% respectively. In general the isolation, purification and alpha-amylase inhibition property of this protein which extracted from wheat seed were confirmed in this study. Inhibition of bacterial alpha-amylase by this protein can be considered by agricultural researchers in biological control of parasites and pests. This alpha-amylase inhibitor can also be used to treat diabetes, digestive deficiencies and modify dietary regimens to reduce weight.

Key words: wheat, enzyme inhibitors, alpha-amylase